

利用辣木茎段建立植株再生体系的研究

王洪峰¹, 韦 强²

(1. 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520; 2. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510520)

摘要: 选择印度改良辣木的幼苗茎段, 经外植体消毒后, 进行了不定芽初代诱导、继代培养、生根诱导和生根苗移植试验, 结果表明: 最适不定芽初代诱导培养基为 MS + 6BA1mg/L + 卡拉胶 5g/L + 糖 30g/L, 继代培养基为 MS + 6BA0.4mg/L + NAA0.2mg/L + 卡拉胶 5g/L + 糖 30g/L, 生根培养基为 1/2MS + IBA0.4mg/L + NAA0.2mg/L + 卡拉胶 7g/L + 糖 20g/L, 最适的生根瓶苗移栽基质为黄心土 40% + 泥炭 60%, 并对微繁体系建立过程中继代苗的玻璃化、生根苗黄化及愈伤头过大、移栽过程中的管理等问题进行了讨论。

关键词: 辣木; 植株再生; 组织培养; 再生体系

中图分类号: S722.3*7

文献标识码: A

Establishment of Regeneration System in Vitro for *Moringa oleifera* with Stem

WANG Hong-feng¹, WEI Qiang²

(1. Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China; 2. South China Botanical Garden of CAS, Guangzhou 510520, China)

Abstract: Experiments were conducted on establishment of regeneration system in vitro for *Moringa oleifera* from selecting seedling stem as explant, and after being sterilized for adventitious bud induction, subculture, rooting induction and transplanting of seedling. Results showed that culture medium MS containing 6-BA 1.0mg/L + karagum 5g/L + sucrose 30g/L was the best for adventitious bud induction, the optimal subculture medium was MS + 6-BA 0.4mg/L + NAA 0.2mg/L + karagum 5g/L + sucrose 30g/L and the optimal rooting culture medium was 1/2MS + IBA 0.4mg/L + NAA 0.2mg/L + karagum 7g/L + sucrose 20g/L. For the rooting plantlets, the optimal transplanting medium was yellow earth 40% + turf 60%. Discussions were made on subculture vitrification, seeding etiolate, overgrowth of callus, and method of seedling transplantation.

Key words: *Moringa oleifera*; plant regeneration; tissue culture; regeneration system

辣木 (*Moringa oleifera*) 为辣木科 (Moringaceae) 辣木属 (*Moringa*) 树种, 又称鼓槌树, 多年生热带乔木, 原产印度北部。辣木因其叶、果的优良食用和药用价值, 果实提取的植物油具独特的工业用途, 被世界誉为“奇迹树”。辣木人工种植较早在我国台湾, 自 20 世纪 90 年代开始在我国海南、福建和广东等地引种种植。辣木种子目前尚比较昂贵, 通过组织培养建立植株再生体系, 是解决辣木种苗供应的有效途径^[1]。本研究选择印度改良辣木 (PKM1) 幼苗茎段, 通过无菌芽诱导, 探索不定芽继代和生根的适宜培养条件, 开展苗木移栽试验, 建立了辣木的植株再生体系, 可用于苗木大量的繁育。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

将印度改良辣木种子(50粒)播于经1%KMnO₄消毒的河砂中进行育苗,播种12d后,幼苗茎段高5cm时,剪取茎段中部作为外植体,长度2cm;先用清水浸泡12h,再用2%次氯酸钠浸泡消毒5min,无菌水漂洗后放入无菌操作台;在无菌操作台上,先用75%酒精震荡漂洗1min,酒精灭菌后的外植体用无菌水冲洗3次后,将0.1%升汞倒入装有外植体的瓶中,以浸泡的方式静置3min,用无菌水冲洗2次;再倒入0.1%升汞,以振荡的方式进行灭菌处理2min,最后用无菌水冲洗5次^[2,3]。

1.2 试验方法

1.2.1 不定芽诱导 诱导无菌芽的基本培养基为MS,添加卡拉胶5g/L,糖30g/L,激素为1mg/L 6BA, pH 5.8;将消毒处理后的幼苗茎段(长度2cm)斜插在培养基中,每个培养瓶接入一个茎段;培养条件为12h光照,12h黑暗,光照强度3000~5000lx,培养温度25~28℃,诱导分化期60d。

1.2.2 继代培养 当不定芽长至3.0~5.0cm时,将其切成含顶芽或一个侧芽的1.5cm茎段,切除叶片,按不定芽诱导的9个激素配比(表1),每个培养瓶接入3个芽,开展继代培养,培养25d统计不同激素条件下芽的分化数、生长速度及愈伤情况。

1.2.3 生根诱导 取生长正常,高3cm的芽段,每瓶接入3个芽,进行生根诱导;基本培养基为1/2MS,添加卡拉胶7g/L,糖20g/L,添加激素设立9个配比(表1)。

培养条件为接种后进行5d暗培养,用荫网控制光照强度在800lx以下,暗培养后的培养条件为12h光照,12h黑暗,光照强度3000~5000lx;整个培养过程控制培养温度25~28℃。统计30d的根系数量、粗壮程度、须根状况、愈伤状况。

1.2.4 生根苗移栽试验 生根苗开瓶炼苗3d后进行移栽;设立3种不同基质的移栽试验,纯黄心土、黄心土40%+泥炭60%、纯泥炭,营养袋为8cm×12cm的聚乙烯塑料袋。观察苗木生长成活及顶芽生长状况。

表1 继代和生根培养的不同激素不同浓度处理
Table 1 Hormone treatment for subculture and rooting
mg·L⁻¹

处理编号	继代培养		处理编号	生根培养	
	6BA	NAA		IBA	NAA
R1	0.4	0.1	S1	0.6	0.2
R2	0.6	0.2	S2	0.8	0.4
R3	0.8	1.0	S3	0.8	0.2
R4	0.4	0.2	S4	0.6	0.4
R5	0.6	0.4	S5	0.4	0.4
R6	0.8	0.6	S6	0.2	0.4
R7	0.6	0.4	S7	0.2	0.2
R8	0.8	0.8	S8	0.4	0.2
R9	1.0	1.0	S9	0.0	0.4

2 结果分析

2.1 不定芽诱导结果

经消毒处理后的茎段,转入初代诱导培养基MS+6BA 1mg/L+卡拉胶5mg/L+糖30mg/L中,经60d诱导后的结果如表2。

表2 辣木茎段初代培养结果(60d)
Table 2 Culture result of primary clone

接种瓶数	未污染数	愈伤开始出现的时间/d	不定芽开始分化的时间/d	60d时芽的平均高度/cm	单株分芽平均数/株
10	8	22	32	3.7	1.75

未污染的辣木茎段,均能诱导出不定芽;在培养过程中,均首先出现愈伤组织,出现时间为接种后的第22天;从第32天开始,膨大的愈伤组织上有浅绿色不定芽生出,单株不定芽为1~2株,第60天时芽的平均高度为3.7cm。

2.2 继代培养结果

继代培养25d后,继代芽叶片和茎的生长状况如表3。

从表3可以看出:

- (1) 不同激素配比处理培养25d后,继代芽的增殖率为2.8~3.6,说明辣木的萌芽能力较强。
- (2) 继代芽萌芽均从愈伤组织上萌发,处理R9的愈伤组织最大,超过了芽底端直径的3倍,其次为R3、

R6 和 R8，都是高 6BA 浓度的组合；其中愈伤组织最小的是 R1 和 R4 两个组合。

表 3 不同激素处理 25 d 后继代芽生长情况
Table 3 Subculture bud growth 25 days after treatment of different hormones

处理编号	接种瓶数	每瓶分芽平均数/株	增殖率/倍	愈伤情况	25d 芽的平均高度/cm	继代芽质量		
						叶片数/片	叶片状况**	茎特征***
R1	3	8.3	2.8	+	3.7	5	+++	+++
R2	3	9.0	3.0	++	3.9	5	++	++
R3	3	10.0	3.3	+++	4.1	3	+	+
R4	3	9.0	3.0	+	3.8	5	+++	+++
R5	3	9.3	3.1	++	4.0	5	++	+++
R6	3	9.7	3.2	+++	4.2	3	+	+
R7	3	10.3	3.4	++	3.6	5	++	++
R8	3	10.0	3.3	+++	3.9	3	+	+
R9	3	10.7	3.6	++++	4.2	3	+	+

*愈伤情况的主要指标：愈伤组织的厚度超过芽底端直径 3 倍，为愈伤头很大，表示为++++；愈伤组织的厚度超过芽底端直径 2 倍，为愈伤头大，表示为+++；愈伤组织的厚度超过芽底端直径 1 倍，为愈伤头较大，表示为++；愈伤组织的厚度不超过芽底端直径 1 倍，为愈伤头较小，表示为+；**叶片状况的主要指标：叶片舒展，叶色正常，表示为+++；叶片相对较小，叶色淡绿，表示为++；叶片较小，叶色为黄色，表示为+；***茎特征的主要指标：芽茎绿色，生长正常，表示为+++；芽茎淡绿色，轻微玻璃化，表示为++；芽茎黄色透明，明显玻璃化，表示为+。

(3) 继代芽高度以 R9、R5 组合最大，均为高 NAA 浓度组合；其它组合的继代芽高度生长均在 2cm 以上，说明辣木是一个相对较速生的树种。

(4) 从继代芽质量上看，组合 R9、R8、R6、R3 只有 3 片叶，其它组合均有 5 片叶；叶片舒展的组合为 R1 和 R4；芽茎出现明显玻璃化的组合为 R3、R6、R8 和 R9，组合 R1、R4 和 R5 茎芽生长正常。

综上分析，选择组合 R4，即 MS + 6BA0.4 mg/L + NAA0.2 mg/L + 卡拉胶 5 g/L + 糖 30 g/L 作为继代培养基，其形成的愈伤组织较小，增殖率为 3.0，继代培养 25 d 芽高度 3.8 cm，叶片 5 片，叶片舒展，叶色正常，无玻璃化现象。

2.3 生根培养结果

生根培养 30 d 后的根系主根、须根状况及生根苗的苗高、叶片、茎的状况如表 4。

表 4 不同激素处理生根培养 30 d 后生根苗状况
Table 4 Root growth 30 days after treatment of different hormones

处理编号	接种株数 /株	生根株数 /株	生根率 /%	根系愈伤情况	平均每株新根数	根系情况	苗木茎叶质量		
							苗高/cm	叶片状况	茎特征
S1	9	9	100	++	2.7	++	3.2	++	++
S2	9	9	100	+++	2.3	+	3.5	+	+
S3	9	9	100	++++	2.7	+	3.1	+	+
S4	9	9	100	+	3.3	+++	3.9	+++	+++
S5	9	9	100	+	1.7	++	3.3	+++	+++
S6	9	8	89	+	1.3	+++	3.4	+++	+++
S7	9	8	89	+	1.3	++	3.1	+++	+++
S8	9	9	100	++	1.7	++	3.1	+++	+++
S9	9	5	56	+	0.9	++	3.1	+++	+++

注：根系状况的主要指标：主根柔软，有明显须根，表示为+++；主根较柔软，须根不明显，表示为++；主根少而粗大，没有须根，表示为+；愈伤状况、叶片状况和茎特征同上。

从表 4 可以看出：

(1) 在 9 个生根处理中，不添加 IBA 的处理 S9 生根率最低，仅 56%，较低 IBA 浓度的 S6、S7 处理的生根率也只有 89%，而其它处理的生根率均达到 100%，这说明激素 IBA 对辣木继代苗的生根作用影响较大。

(2) 不同处理生根苗下端的愈伤组织大小差别很大，其中愈伤组织最大为 S3 和 S2 两个组合，其次为 S1 和 S8 两个组合；其余组合的愈伤组织均较小。

(3) 平均每株苗木的根系数，从 0.9 到 3.3 不等，单株根系最多的是组合 S4，其次为 S3 和 S1；根系状况最好的是 S4 和 S6，根系柔软，有明显须根；最差的是 S2 和 S3 两个组合，其根系少而粗大，没有明显须根。

(4) 生根瓶苗的生长速度最快为组合 S4，30 d 苗高 3.9 cm，比接种时增加了 0.9 cm；其次为组合 S2 和 S6，其余组合基本保持接种时的高度；不同激素组合的生根苗茎叶质量也有较大差异，组合 S1、S2 和 S3，叶片均较小，叶色淡，茎段出现不同程度的玻璃化。

综上分析，选择组合 S4，即 1/2MS + IBA0.4 mg/L + NAA0.2 mg/L + 卡拉胶 7 g/L + 糖 20 g/L 作为生根培养

基, 形成的生根苗, 根系基本是从茎芽的下端切口处生出, 组织较小, 根系与茎段的维管束连结较好, 所形成的根系不易脱落; 生根率可达 100%, 单株根系数量为 3.3, 且主根柔软, 有明显的须根; 培育 30 d 苗高 3.9 cm; 苗木叶片舒展, 叶色正常, 无玻璃化现象。

2.4 移栽试验结果

将培养 30 d 的生根瓶苗, 开盖在 95% 的荫网条件下, 炼苗 3 d 后, 辣木的根系略带黄色时移入不同基质中。60 d 后观察其存活率、生长高度及生长状况, 结果如表 5。

表 5 移植苗在不同基质中的生长情况 Table 5 Growth of transplanted seedling in different substrates					
处理	移苗数/株	成活株数/株	成活率/%	平均苗高/cm	生长过程
纯黄泥	50	35	70	22	肉质茎有不程度腐烂, 叶色略黄
黄心土 40%+泥炭 60%	50	46	92	32	肉质茎生长良好, 叶色正常
纯泥炭	50	44	88	30	肉质茎生长正常, 叶色正常

从表 5 可以看出, 以黄心土 40%+ 泥炭 60% 的基质移栽辣木组培苗效果最好。辣木为肉质根, 水分太多易腐烂, 这也是纯黄泥移栽成活率不高的主要原因; 纯泥炭由于水分及肥分保持能力较差, 相对掺杂有黄心土的基质, 生长偏慢。

3 讨论与建议

(1) 辣木是一个热带速生树种, 在组织培养过程的继代阶段, 对细胞分裂素特别敏感, 极易玻璃化。玻璃化是在芽分化启动后的生长过程中, 由碳水化合物、氮代谢和水分状态等发生生理性异常所引起, 它由多种因素影响和控制, 主要有: 温度、光照、激素种类和浓度、琼脂用量、酸碱度、糖浓度、碳氮比、乙烯等^[4]。在辣木微繁殖体系建立和生产过程中, 为减少玻璃化, 在继代阶段, 通过光照的调节, 能有效地控制玻璃化苗出现^[5]。

(2) 辣木易萌芽易生根, 但生根过程中, 底端的愈伤组织大小直接影响苗木移栽成活率。组织过大(如厚度超过茎端直径 3 倍), 所形成的根系不能与茎部维管束紧密连结, 洗去培养基的过程中, 根系极易脱落, 所以控制生根苗的愈伤组织, 是生产高质量生根苗的关键^[6,7]。

(3) 辣木生根苗培养过程中, 叶片黄化现象很易出现, 表现为从顶端开始, 茎段逐步枯黄, 即使根系良好也经常出现; 试验和生产过程中, 通过调节卡拉胶用量可减少黄化现象出现。

(4) 辣木具肉质根, 以黄心土 40%+ 泥炭 60% 的基质移栽辣木组培苗效果较好, 移栽过程的水管理也十分重要。试验表明, 移栽前 15 d, 适当遮荫和精细的叶面水管理是移栽成活的关键; 后期则把握水分供应量多次。

参考文献:

[1] 刘昌芬, 李国华. 辣木的研究现状及其开发前景[J]. 云南热作科技, 2002, 25 (3) : 20-24.

[2] 林宗铿, 蔡坤秀, 罗金水, 等. 芦笋嫩茎节间无菌外植体建立及其影响因素的研究[J]. 福建热作科技, 2005, 30 (1) : 7-8.

[3] 张月娇. 组织培养中有效无菌材料获得的试验研究[J]. 湖北林业科技, 2004 (3) : 20-22.

[4] 蔡祖国, 徐小彪, 周会萍. 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防[J]. 生物技术通讯, 2005, 16 (3) : 353-355.

[5] 王爱勤, 何龙飞, 裴润梅, 等. 组培条件对不同品种芦荟试管苗玻璃化的影响[J]. 中国农学通报, 2002, 18 (5) : 46-48.

[6] 孙天洲, 武玉暄, 杨玉珍, 等. 光叶楸侧芽组培快速繁殖技术研究[J]. 湖北农业科学, 2004 (2) : 76-79.

[7] 刘文真, 玄松南, 陈惠哲, 等. 几种作用因子对多年生黑麦草组织培养影响的研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17 (1) : 95-101.

[8] 焦海华. 一品红不同外植体愈伤组织诱导能力的研究[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2003, 26 (1) : 65-67.